IgG 抗体精製用モノリスシリカ 96 ウェルプレート

Ex-Pure 96-well ProA/ProG 取扱説明書

本製品は均一な連続孔を持つフィルター型モノリスシリカの固相表面に、(独)産業技術総合研究所の技術を用いてプロテイン A(もしくはプロテイン G)を固定化しております。両技術により、簡単に短時間でのIgG 抗体精製を可能にしました。本製品では弊社抗体精製用スピンカラム(Ex-Pure spin ProA/ProG)に使用されてきたφ4.8mm×1.5mm のゲルを 96 ウェルプレートに充填しております。スピンカラム型に比べて、より多検体での抗体精製にご活用頂けます。

1. はじめに

開封されましたら梱包内容、プレートの概観、数量、溶液などに間違いがないかお確かめ下さい。

・モノリスシリカカラム充填 96 ウェルプレート(Ex-Pure 96-well ProA or ProG)　1 枚

・各種溶液 (吸着溶液、洗浄溶液、溶出溶液、中和溶液※、再生溶液)　各 250mL

※中和溶液は 100mL

・取扱説明書　1 部

2. 取扱い上の注意

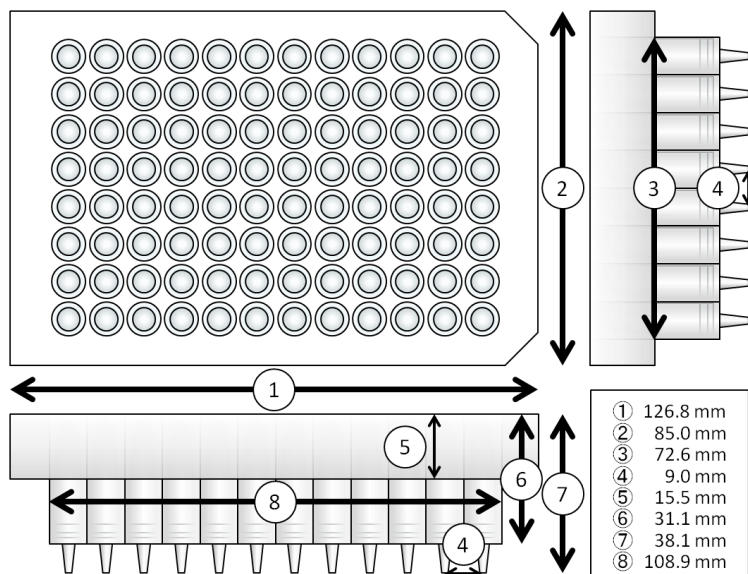
○ プレートを落としたり、ぶつけたりしないでください。強いショックを与えるとモノリスゲルが壊れることがありますのでご注意ください。

○ 各種溶液はろ過滅菌操作を行っておりますが、使用しない場合は冷暗所で保存してください。

○ 操作中は、蓋を外してご使用してください。蓋をすると通液が効率良く行えません。

○ 使用しない時は、冷蔵で保管してください。モノリスシリカゲルが乾かないよう、ウェル内を 20%エタノールで満たしてください。カラム性能が低下する場合があります。

○ 本取扱説明書にカラムの再利用について記載されている箇所がありますが、繰り返し性能を保証するものではありません。また、繰り返し操作に由来する微量のクロス・コンタミネーションの可能性を排除できませんので、再利用する場合はこの点をご理解頂き、お客様の責任の下でご使用ください。

3. 概形・寸法

4. 操作例

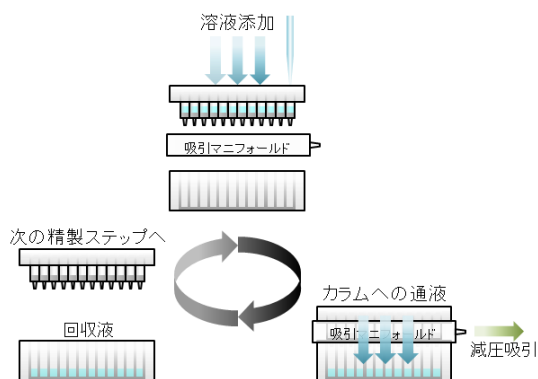



図 1 基本的な操作の流れ

Ex-Pure 96-well の基本的な操作は次のように行われます。まず全てのウェルに溶液を添加し、その後、吐出口があるプレート下面を減圧吸引することによりゲルへの通液が行われ、ゲルを通過した溶液は回収容器を予め設置しておくことで回収されます。(図 1)

代表的な精製操作は次のような手順で行われます。(図 2)※ここに示した手順は一例ですので、ご使用の環境に合わせて最適化を行ってください。

ステップ 1) ウェル内の 20%エタノール溶液を取り除き、吸着溶媒を 200μL 注入し、減圧吸引することによりカラムの平衡化を行う。

ステップ 2) 抗体試料を 200μL 注入し、減圧吸引することにより抗体をカラムに吸着させる。(予め試料の pH を 7 付近に調製しておく。また、必要に応じて試料添加･減圧吸引操作を繰り返すことにより結合容量の範囲でカラムに濃縮することができます。)

ステップ 3) 洗浄溶液を 200μL 加えて減圧吸引を行う。

ステップ 4) サンプリングプレートの各ウェルに中和溶液を 20μL 入れておき、カラムに溶出溶液を 200μL 加えて減圧吸引を行い、通過液を回収する。《注意》ProGカラムの場合は溶 G 溶液と記載されています。

再使用する場合) 再生溶液を 200μL 加えて減圧吸引する操作を数回繰り返す。その後、ステップ 1 の吸着溶液を加える操作から再開する。

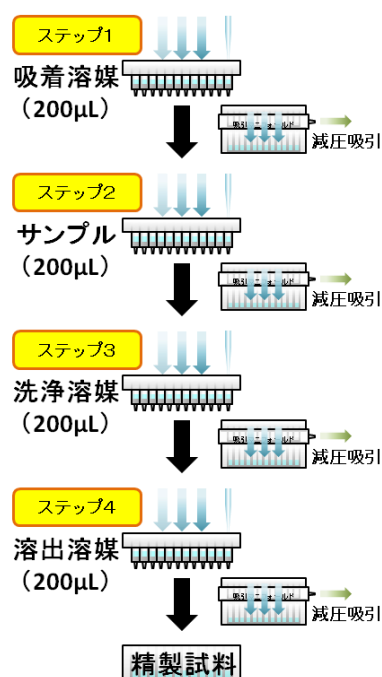



図 2 精製操作の例

5. 参考データ

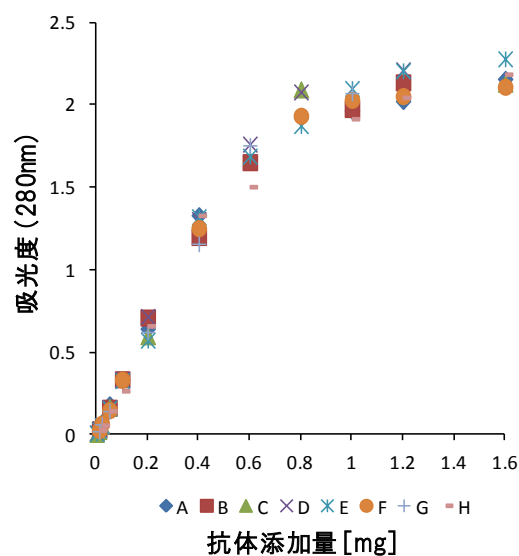



図 3 カラムの結合特性

吸着溶液にヒトポリクローナル抗体を添加した試料を用いて Ex-Pure 96-well ProA で精製を行い、溶出液の吸光度を測定した。抗体添加量:0.01mg～1.6mg (100μL×2 回)、洗浄:1M NaCl リン酸緩衝液(pH=7、100μL×2 回)、溶出:0.1M クエン酸緩衝液(pH=3、60μL×3 回)、吸引条件:5 inHg で 30 秒。

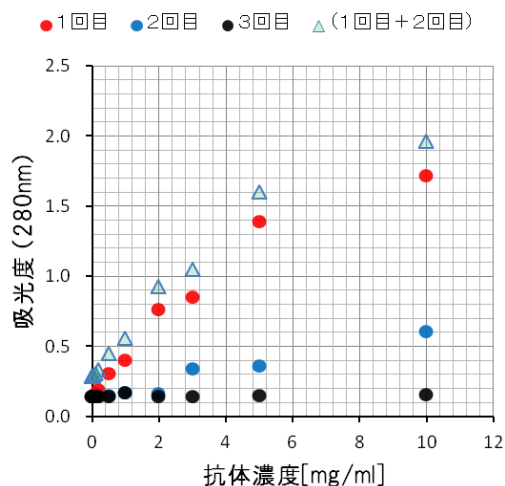



図 4 溶出特性

吸着溶液にヒトポリクローナル抗体を定量的に添加した試料を用いて Ex-Pure 96-well ProA で精製を行い、溶出溶液 100μL を繰り返し添加して各回の溶出液の吸光度を測定した結果。

図 5 Ex-Pure の IgG 添加量-回収量プロット ProA (上)、ProG (下)

吸着溶液に市販のヒトポリクローナル抗体を定量的に添加した試料を用いて Ex-Pure spin ProA および ProG で精製を行った結果。

回収液の電気泳動結果例

図 6 モデル培養液からの抗体精製

モデル試料として、抗体を含まない CHO 細胞培養液に市販のヒトポリクローナル抗体を定量的に添加して用い、Ex-Pure spin ProA で精製を行った。添加量に対する回収量をプロットした結果(上)、および、各精製ステップの SDS-PAGE(下)。

○ Ex-Pure ProA は 0.4 mg までの IgG を 90%以上で回収することができます。また、Ex-Pure ProG は 0.3mg までの IgG を 90%以上で回収することが可能です(図 3、図 5)。さらに、ProG では IgG3 タイプの抗体も精製･回収することができます。※回収率は、抗体の種類、濃度、及び通液速度によって変化します。

○ 本製品の形状と操作方法の特性上、少量の残液が生じます。効果的な分離のためには各精製ステップでの注入を数回に分けて繰り返し(例えば、洗浄で 100μL を2回、溶出で 60μL を 3 回という具合に)行うことを推奨します。(図 4)

※ 図 5 および図 6 は、ゲル形状･固定化リガンド共に本製品で充填されているものと同一のゲルが充填された弊社抗体精製用スピンカラム(Ex-Pure spin)を使用して得られた結果です。

※ 自動分注装置との適合性につきましては、ハミルトン社、ベックマン･コールター社の製品で確認を行っております。ウォーターズ社製品につきましては別途アダプタが必要になりますので弊社までお問い合わせください。

何かご不明な点、もしくはご要望がございましたらいつでもご連絡ください。(株)京都モノテック 水口 TEL 075-432-7740